

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 昭63-267294

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月4日

C 12 P 21/02

A 61 K 37/64

C 07 K 13/00

C-6712-4B

8615-4C

8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全10頁)

⑮ 発明の名称 複合セルピンおよびこれらをコードするDNA

⑯ 特 願 昭63-67041

⑰ 出 願 昭63(1988)3月19日

優先権主張 ⑱ 1987年3月20日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3709255.3

- ㉑ 発 明 者 ヘルマン、ラグ ドイツ連邦共和国ゲルクハイム(タウヌス)アム、キルヒ  
ブラツツ、14
- ㉒ 発 明 者 ゲラルト、ブライビツ ドイツ連邦共和国ゲルクハイム(タウヌス)ヨハン-シユ  
シユ トラウス-シュトラーセ、18
- ㉓ 発 明 者 フリードリッヒ、ハイ ドイツ連邦共和国ハツタースハイム、アム、マイン、エル  
レスリング、40
- ㉔ 出 願 人 ヘキスト、アクチエン ドイツ連邦共和国フランクフルト、アム、マイン、80  
ゲゼルシャフト
- ㉕ 代 理 人 弁理士 佐藤 一雄 外2名

最終頁に続く

## 明 細 書

ことを特徴とする、複合セルピンの製造法。

## 1 発明の名称

複合セルピンおよびこれらをコードする  
DNA4. 宿主細胞が高等真核細胞である、請求項  
3に記載の製造法。

## 2 特許請求の範囲

1. ヒトロイセルピン-2(hLS2)の遺  
伝子構造を有するエクソンに実質的に対応するア  
ミノ酸の部分配列を含む、複合セルピン。5. hLS2に対応する遺伝子構造を有する  
セルピン遺伝子のエクソンを含み、hLS2に對  
応する遺伝子構造を有する置換え遺伝子。2. hLS2、 $\alpha_1$ -抗トリプシンまたはアン  
ジオテンシンノーグレンのエクソンに対応するアミノ  
酸の部分配列を含む、請求項1に記載の複合セル  
ピン。6. エクソンが、関連イントロンのスプライ  
シングシグナルおよび分枝ポイントを両面に有し  
ている、請求項5に記載の遺伝子。3. hLS2のエクソン/イントロン構造を  
有してセルピンをコードする少なくとも二つの遺  
伝子からのエクソンからの、hLS2に対応する  
遺伝子構造を有する遺伝子の置換え工程およびこ  
の置換え遺伝子の宿主細胞での発現工程からなる7. hLS2のエクソンを含むゲノムDNA  
フラグメント。

8. hLS2からのゲノムDNA。

9. 請求項5から7までのいずれか1項に記  
載のDNAでトランスフェクションさせた宿主細  
胞。10. 請求項1または2に記載の複合セルピ  
ンを含む、医薬物。11. 請求項7または8に記載のゲノムDNA  
の全部または一部を含む、診断用剤。

12. ヒトDNAと、請求項7または8に記載

のDNAとのまたは対応するRNAとのハイブリダイゼーションからなる、診断法。

### 3 発明の詳細な説明

欧州特許出願(E P-A)公開第0,190,652号には、そのときから「ロイセルビン-2」(hLS2)と命名されたヒトセルビンが開示されている。このE P-Aでは、また、hLS2のcDNAを再生しており、個々のアミノ酸が置換、削除または挿入されている適宜に修飾されたタンパク質を産生する修飾遺伝子または部分遺伝子の調製の可能性についても指摘している。例えば、「修飾アロク原理」について言及しているが、これは、活性中心の上流のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子Iを、活性中心の下流のアミノ酸配列をコードする部分遺伝子IIと結合させて、その間に活性中心をコードする遺伝子フラグメントを挿入するものである。

hLS2をコードするゲノムクローンが今や見出され、その遺伝子構造が決定された。この遺伝

子構造は、本発明によって新規の複合セルビンの製造に利用される。

セルビンは、血液凝固、補体の活性化および炎症反応の種々の局面においてプロテアーゼインヒビターとして機能する一群のタンパク質である。セルビンは、相互のアミノ酸の相同率が約20-35%であるタンパク質の一族に属している(R. F. Boollittle, Science 222 (1983) 417-419; H. Ragg, Nucl. Acids, Res. 14 (1986) 1073-1088)。これらのプロテアーゼインヒビターの特性は、一方では、反応中心のP1位置のアミノ酸によって決定され(M. Laskowski および I. Kato, Annu. Rev. Biochem. 49 (1980) 593-629)、他方では、明らかにまたセルビンの活性に影響を及ぼす他のアミノ酸配列および構造因子によっても決定される。これに加えて、あるセルビン、例えば、アンジオテンシンノーゲンなどでは、N末端領域が独立した機能的および構造的役割を果している(S. Synder および R. Innis, Annu. Rev. Biochem. 48 (1979) 755-782)。

セルビンの一次および三次構造は、相互に類似している(H. Loebermann ら: J. Mol. Biol. 177 (1984) 531-556; S. C. Bock ら: Biochemistry 25 (1986) 4292-4301)が、意図したことには、これは、例えば、グロビンなどの他の多くのタンパク質族の場合のように同一の遺伝子構造に基づくものではない。これまでに述べられてきたセルビン遺伝子の中では、ヒト $\alpha_1$ -抗トリシンおよびラットアンジオテンシンノーゲンをコードする遺伝子のみが相同するエクソン/イントロン構造を有する(T. Tanaka ら: J. Biol. Chem. 259 (1984) 8063-8065)。各々、5個のエクソンが対応する位置で4個のイントロンで分離されている。しかしながら、これまでに知られている他のセルビン遺伝子の構造は、このパターンとはかなり異なっている。ヒト抗トリシン四遺伝子は、6個のエクソンを含む(E. V. Prochovnik ら: J. Biol. Chem. 260 (1985) 9608-9612)が、相同性は、 $\alpha_1$ -抗トリシンまたはアンジオテンシンノーゲンの5個のイントロン位

置のひとつとの間に認められるだけである。ヒトC1インヒビターをコードする遺伝子は、少なくとも7個のイントロンを有するが、これらの位置はまだわかっていない(S. C. Bock ら: 同出)。

イントロンの数および位置の点から、hLS2遺伝子構造は、 $\alpha_1$ -抗トリシンおよび(ラット)アンジオテンシンノーゲンの遺伝子構造に対応することが現在明らかになった。この相同性は、本発明によって、複合セルビンの製造に利用される。

本発明は、その種々の態様について特許請求の範囲に定義されている。本発明の展開および好ましい実施態様は、以下に説明される通りである。本発明は、また、第1図および第2図、および表1によって表される(ここで、あるいは以下にいう「第2図」は、その連続である第2a図を含むものとする)。

第1図は、hLS2遺伝子構造を図式化して示したものである。「Ex 1」~「Ex 5」はエクソンを表す。制限酵素切断部位は、次のように略称されている。

B = BamHI    N = NcoI  
 Bg = BglII    Ss = SstI  
 E = EcoRI    X = XbaI  
 H = HindIII

BglIIおよびNcoIの場合、第2図のように複合遺伝子の構築に必要な切断部位のみが表示されている。

第2図(正しい比例尺ではない)は、複合セルピン遺伝子の構造を示したもので、この遺伝子は、hLS2のエクソン1から4までを有し、第1図のように中実線で表示されて「Ex1」～「Ex4」と命名されている。この遺伝子は、さらにヒト $\alpha_1$ -抗トリプシン遺伝子の3'末端エクソンを有し、これは、図中斜線つき線で示されて「Ex $\alpha_1$ -AT」と命名されている。

制限酵素の慣例名称の略称は、第1図と同様であるが、さらに次の略号を用いた。

P = PstI  
 S = SalI  
 Sm = SmaI

阻害作用を示す物であること、を意味する。「複合セルピン」という表現は、また、異なる経路からの同一のエクソンの組合せによって理論的に得られる自然の産生物を除外する意味をもつ。「実質的に」とは、遺伝子操作によって得られる産生物は、公知の方法、例えば、アミノ酸の追加、削除または置換などによって修飾することができるという事実を蓋するものである。これらのタイプの修飾は、例えば、適当なリンカーまたはアダプターの挿入によって可能である。

本発明に係る組換え遺伝子の製造においては、合成遺伝子フラグメントを用いることも可能である。この方法には、制限酵素の切断部位が追加されて導入される可能性があり、これによってコードされるアミノ酸配列の追加修飾が可能になるという利点がある。このようにして、例えば、活性中心を修飾すること、一般には、変化した基質特異性および/または活性を有する複合セルピンを製造することも可能になる。

エクソンの置換えにおいて、エクソンは、スプ

Xh = XhoI

K = クレノウポリメラーゼで埋填

S1 = S1 スクレアーゼで分解

Ph = アルカリホスファターゼ

L = リンカー

△は、突出末端を分解または埋填によって平滑末端にした切断部位を表す。

表1は、エクソンおよびhLS2遺伝子の側面(fanking)領域のDNA配列を示す。ここで、イントロン配列は、小文字で表示されている。正しい3'転写末端の形成に必要なシグナルペプチドおよびシグナルAATAAには下線を施した。エクソン/イントロン境界は、既知のhLS2 cDNAとの比較から明らかにされたものである。矢印は、今までに見出された最長のhLS2 cDNAクローンの5'開始点を示す。

本発明において用いる用語「複合セルピン」は、当該タンパク質が、実質的にはhLS2エクソンに対応するアミノ酸ブロックおよび同じ遺伝子構造を有する相似セルピンから成り、プロテアーゼ

ライジングおよび他の転写後の処理に必要なイントロン内の全ての必要配列を包括して有効に用いられる。連結のためには、例えば、突出しているDNA配列を分解または埋填によって平滑末端にすることができ、こうしてエクソンは、必要であれば、有用な制限酵素の基質として作用する合成オリゴヌクレオチドリンカーの挿入物と適宜連結することができる。

このタイプのエクソンモジュールは、本発明によると、相互に正しい相対的配置方向にあって、正しい配列であれば、実質的にはいかなる所望の組合せにおいてもリガーゼ反応で組み立てることができる。このようにして得られる複合遺伝子は、用いられるプロモーターがセルピン固有のものでなければ、適切な真核細胞のプロモーターに連結することができ、必要に応じて、ポリアデニレーションシグナルに連結でき、さらに、適当な真核細胞に導入した後、それらの発現をそこで行うことが可能である。

昆虫や哺乳類細胞のような高等細胞を、宿主ノ

ベクターシステムとして既知の方法で用いることが可能である。これらのタイプの真核細胞発現システムが、今や多数知られている。必要に応じて、形成されている複合セルピンmRNAを単離すること、およびこれを用いてcDNAを合成して、これに適当な転写シグナルを付けた後、細胞または酵母中で発現させるの用いることも可能である。酵母が用いられる場合には、酵母に特異的な糖化タンパク質を得ることが可能である。

変化させた基質特異性または活性を有する複合セルピンの産生の可能性の他に、本発明は、ふたつの機能を有するタンパク質の製造方法を提供する。これらタンパク質は、例えば、アンジオテンシンIIおよび抗トリプシンの活性を含み、したがって、水分平衡を調節するだけでなく、エラストーゼ機能に対する阻害効果をも有する。

さらに、本発明は、hLS2のゲノムDNAの全部または一部を含む診断的補助物に関する。これら補助物は、hLS2遺伝子中の遺伝的欠損の検出またはヒトDNAまたはRNAを含む材料を

対応する遺伝子プローブとハイブリダイゼーション(対合)させる診断的方法に使用されるものである。

本発明の詳細は、次の諸例に説明される通りである。とくに記載がない限り、パーセント表示は重量パーセントを表す。

#### 例1:

#### ヒト給養遺伝子バンクからのhLS2コスミドの単離

コスミドバンクの構築は、W. Lindenmaierらの方法(35th Moshach Colloquium 1984, "The Impact of Gene Transfer Techniques in Eukaryotic Cell Biology", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1985)によって、ClaIおよびアルカリホスファターゼで処理しておいたベクターpHC79-2cos/TKに結合させた、MspIで部分切断しておいたヒトゲノムDNAフラグメントを用いて行った。コスミドバンクは、約300,000個の独立したクローンを含む。

1.  $8 \times 10^6$ 個にパッケージングされたコスミドを、5mlのTM緩衝液(50mMトリス-塩酸、pH7.5, 10mM  $\text{MgSO}_4$ )および5mlの大腸菌DH1の一晩培養物と混合して、37°Cで20分間振とうせずにインキュベートした。この大腸菌培養は、0.4%マルトースを含むNZ培养基(10g/gal NZアミン、5g/gal 塩化ナトリウム、2g/gal  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、4g/gal チアミン)中で37°Cで増殖させておいたものである。4g/gal チアミンを含む40mlのLB培养基(10g/gal バクトトリプトン(ディフコ社製)、5g/gal 酵母抽出物(ディフコ社製)、10g/gal 塩化ナトリウム)を添加後、培養液を37°Cで1時間振とうした。

このタイプの細菌培養の試料5mlを寒天プレート(23×23cm, 1.4%寒天および50μg/mlアンピシリンを含む)表面の高圧滅菌したニトロセルロース膜上にまいた。コロニーの半径が0.5mmになるまで、プレートを37°Cで培養し

た。レプリカフィルターの調製、ハイブリダイゼーションのためのコロニーの溶解および固定は、既知の方法にて行った(D. Hanahan および M. Meselson: Methods in Enzymology 100 (1983) 333-342; T. Maniatis ら: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, (1982)。フィルターは、前洗浄液(Maniatis ら: 前出、326頁)にて42°Cで1時間洗浄した。前ハイブリダイゼーション(4-6時間)およびハイブリダイゼーション(60°Cで16時間)を、次の溶液中で行った。

0.9 M NaCl  
0.18 M トリス-塩酸、pH8.0  
5×デンハートの溶液  
0.2% (w/v) SDS (ソジウムデシルサルフェート)

200μg/ml せん断加熱処理した酵母DNA

200μg/ml 酵母RNA

0.5% (v/v) 非イオン系洗浄剤(ノニデトP-40、シグマ社製)

ハイブリダイゼーションに用いたプローブは、

次のhLS2cDNA制限酵素フラグメントであった(EP-A第0,190,652号)。

- A) プラスミドpH14からの1.07kb HindⅢフラグメントであって、hLS2cDNAの5'側半分を含む。
- B) プラスミドpL10/2からの0.5kb XmnⅠフラグメント。このフラグメントは、hLS2cDNAの3'側半分(位置1121-1619)に位置している。

上記のフラグメントは、各々、関連のプラスミドを記述の制限酵素で処理することによって切断して取り出して、アガロースゲルにて分離し、電気的に溶出させた後にニクトランスレーション法に供した。(≥10<sup>6</sup>cpm/μg; Maniatisら: 前出)。

ハイブリダイゼーションの後、膜を、室温、45℃および60℃で0.1% SDSを含む0.1×SSC(1×SSC=0.15M NaCl、15mMクエン酸ナトリウム、pH 7.0)で各々30分洗浄した。

もし下記にhLS2cDNAの種々の制限酵素フラグメントとのハイブリダイゼーションによって行った。

プローブ1: hLS2cDNAの位置1と310との間の領域を含むHindⅢ/BamHⅠフラグメント(HindⅢ部位は、hLS2cDNAがクローニングされるベクターpUC13のポリリンカー領域に位置する)。

プローブ2: hLS2cDNAの位置311から834までを含むBamHⅠフラグメント。

プローブ3: 位置984と1399の間の領域を含むPvuⅡフラグメント。

プローブ4: 位置1121と1619の間の領域を含むXmnⅠフラグメント。

プローブ5: 位置1560と2081の間の領域を含むEcoRⅠフラグメント(EcoRⅠ部位のひとつは、ベクターpUC13のポリリンカー領域に位置している)。

ここに明記した制限酵素切断部位の位置は全て、cDNAのコード鎖に係るものである。

乾燥後、これらの膜をX線フィルムの露出に使用した。ハイブリダイゼーションしているコロニーを、希釈によって単離して、ニトロセルロース膜上で培養し、溶解し、さらに記述したように、ハイブリダイゼーションに供した。さらに単離操作を行った後に、全750,000個の分析されたコロニーのうち、3個の独立したハイブリダイゼーション陽性のクローンが残った。クローンp4Rは、プローブAとのみ対合し、プローブBとは対合しなかった。これとは逆に、クローンp6Rおよびp9Rは、プローブBとのみ対合し、プローブAとは対合しなかった。

クローンp4R、p6Rおよびp9RからのコスミドDNAをアルカリ溶解法にて分離した(Maniatisら: 前出)。DNA調製物を種々の制限エンドヌクレアーゼで切断して、0.7%または1%のアガロースゲルにて分離し、ニトロセルロース膜上にまいた(E. Southern: J. Molec. Biol. 98 (1975) 503-517)。コスミドのエクソンを含むDNAフラグメントの同定は、放射線ラベ

ハイブリダイゼーションは、各々42℃で一晩上記のハイブリダイゼーション緩衝液で行った。その後、膜を、0.1% SDSを含む2×SSC中で室温で2×15分間、次いで、0.1% SDSを含む0.1×SSC中で42℃で2×15分間洗浄して、乾燥してX線フィルム上に露出させた。プローブを除くために、膜を各々熱擦板中で2分間インキュベートして、これを再びハイブリダイゼーションに用いた。

第一のエクソン(Ex1)の同定のために、DNA配列

3'-CGCGGTGAAGAGCTTTGTGCTC-5'

(これは、通常の5'-3'方向とは逆に表示されている)を有するオリゴヌクレオチドをホスホルアミダイト法(M. D. Matteucciら: J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 3185-3191)によって合成し、ポリアクリルアミド/尿素ゲルにて精製した。オリゴヌクレオチドの配列は、T. Kuyhnらの方法によって得られたλgt10cDNAバンクから分離されたヒトhLS2cDNA配列に基づいた。

この方法は、D. M. Glover (編集)、DNA Cloning, a Practical Approach, Vol. 1, IRL Press, Oxford UK, Washington, D.C. 1985、49-78頁に記述されている。クローン p 4 R のコスミド DNA を、サザンテクニックを用いて上記のように分析した。上記の DNA 配列を有するオリゴヌクレオチドを  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (NEB) およびポリヌクレオチドキナーゼ (Maniatis ら: 前出) を用いて放射線ラベルした。ハイブリダイゼーション温度は 42°C であった。

膜を、6×SSC で室温で (2×15分間) および 33°C で (2×30分間) 洗滌した。

ハイブリダイゼーション実験を基にして、コスミドの蔵査している制限酵素フラグメントを、標準法によってベクター p UC 13 にサブクロニングした。エクソンおよび隣接するイントロン領域をマクサム-ギルバート化学分解法にて配列決定した (A. Maxam および V. Gilbert, Methods in Enzymology 65 (1980) 499-560)。第 1 図は、配列決定、さらに制限酵素切断およびサザンプロッ

ティングによって得られた h L S 2 遺伝子の構造を图示したものである。

## 例 2:

h L S 2 遺伝子の側面に位置するイントロン配列を含むエクソンのサブクロニングおよび

h L S 2- $\alpha$ -1 族トリプシン遺伝子の構築

発現可能な融合セルリン遺伝子の構築は、例を示すことによって、また、表 1 (および第 2 図) を参照して説明される。もちろん、記述されている制限フラグメントの代わりに、他の適当な DNA フラグメントおよび DNA フラグメントの他の組合せを用いることは可能である。とくに、h L S 2 特異性プロモーター領域の代わりに、他の真核細胞プロモーター、例えば、他のセルリン遺伝子からのものを用いることも可能である。

表 2

①制限フラグメント ②含有物 ③末端の修飾およびサブクロニング

① 1. 6 kb Nco I / Eco R I

② プロモーター領域を含む h L S 2 遺伝子のエクソン 1

③ 大腸菌からの DNA ポリメラーゼ I のクレノウフラグメントによる埋填; Sal I による切断および S1 スクレアーゼによる処理をしておいたベクター p UC 13 へのサブクロニング

① 1. 3 kb Xba I / Hind III

② h L S 2 遺伝子のエクソン 2 (中でもシグナルペプチドをコードする)

③ クレノウフラグメントによる埋填; Bam H I および S1 スクレアーゼによって処理をしておいたベクター p UC 13 へのサブクロニング

① 0. 65 kb Sst I / Sst I

② h L S 2 遺伝子のエクソン 3

③ S1 スクレアーゼによる切断; Sal I による切断および S1 スクレアーゼによる処理をしておいたベクター p UC 13 へのサブクロニング

① 1. 0 kb Bgl II / Bam H I

② h L S 2 遺伝子のエクソン 4

③ クレノウフラグメントによる埋填; Sma I およびアルカリホスファターゼによる処理をしておいたベクター p UC 13 へのサブクロニング

全てのエクソン含有制限フラグメントは、エクソン/イントロン境界部に正しいスライシングに必要な DNA 配列をも含んでいる (B. Ruskin ら: Cell 38 (1984) 317-331; E. Keller ら: Proc. Acad. Sci. USA 81 (1984) 7417-7420; B. Vieringa ら: Cell 37 (1984) 915-925)。

アガロースゲルでの DNA フラグメントの単離、フラグメント末端の処理およびベクター p UC 13 へのサブクロニングは、標準法 (Maniatis ら: 前出) に行う。挿入物の位置方向は、制限酵素切断によって確認して、正しい挿入位置方向を有するプラスミドを融合セルリン遺伝子の構築に用いる。

正しい配列における h L S 2 遺伝子のエクソン 1 から 4 の連結およびエクソンの相互に正しい位置方向へ配置は、同様に既知の方法で行う。

## 例 3:

h L S 2- $\alpha$ -1 族トリプシン遺伝子の 3' 末端エクソンのサブクロニング

遺伝子の 3' 末端エクソンを有する 1. 7 kb の







## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のhLS2遺伝子の構造を示す、説明図である。

第2図および第2a図は、本発明の融合セルにhLS2遺伝子の構造を示す、説明図である。

代理人 佐藤 一 雄

FIG. 1

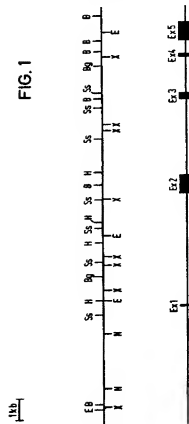


FIG. 2

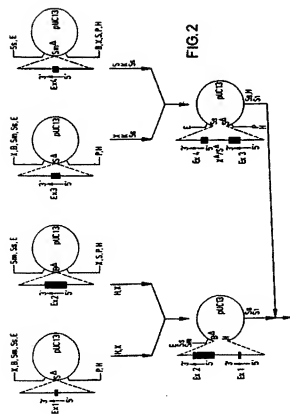
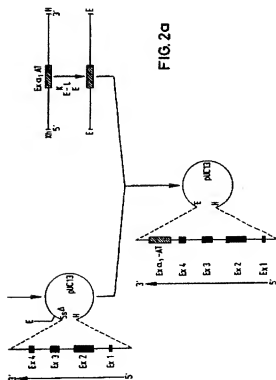


FIG. 2a



## 第1頁の続き

④Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 15/06		8318-4H
C 12 N 5/00		B-8515-4B
		A-8412-4B
G 01 N 33/50		P-8305-2C
//(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91)		

④発明者	オイゲン、ウールマン	ドイツ連邦共和国グラスヒュツテン/タウヌス、ツム、 タールブリック、31
④発明者	ウエルナー、リンデン マイアー	ドイツ連邦共和国ザルツギッター・リンゲルハイム、トレ ツベンカムプ、10